

BEST AVAILABLE COPY

Rec'd PCT/PTO 29 JUN 2004

ST/JP02/12917

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

10/500293

10.12.02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年10月29日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-314658

[ST.10/C]:

[JP 2002-314658]

出 願 人

Applicant(s):

独立行政法人農業生物資源研究所
大野 清春

REC'D 07 FEB 2003

WIPO

PCT

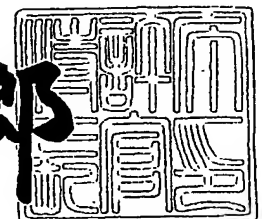
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 1月21日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2002-3107801

【書類名】 特許願

【整理番号】 MOA-A0209

【提出日】 平成14年10月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 2 独立行政法人 農業
生物資源研究所内

【氏名】 小松 節子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 2 独立行政法人 農業
生物資源研究所内

【氏名】 高岩 文雄

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 神戸大学遺伝子実験
センター内

【氏名】 大野 清春

【特許出願人】

【識別番号】 501167644

【氏名又は名称】 独立行政法人農業生物資源研究所

【特許出願人】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 神戸大学遺伝子実験
センター内

【氏名又は名称】 大野 清春

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【その他】 国等以外の全ての者の持分の割合 010/100

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 標識された核酸またはタンパク質の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標識された核酸またはタンパク質を製造する方法であって、核酸またはタンパク質とLSIとを結合させ、特定の情報をLSIに記録することを特徴とする方法。

【請求項2】 特定の情報が、LSIが結合される核酸または蛋白質の特徴である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 核酸またはタンパク質とLSIとの結合において、基質を介在させる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 基質が、セルロース酢酸ビニル、アルファシアノアクリレート、シリコン変性ポリマー、エポキシ樹脂、および硫酸カルシウムからなる群より選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 タンパク質とLSIとの結合において、該タンパク質に結合する抗体を介在させる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 タンパク質の糖鎖とLSIとを結合させ、タンパク質の糖鎖の特徴をLSIに記述する、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標識された核酸またはタンパク質を製造する方法に関し、特に標識がアイソトープや色素によらない方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、核酸やタンパク質を識別し、同定するための手段としては、一般的に、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{125}I などの放射性同位元素を利用して核酸やタンパク質を標識することが行われてきた。また、多種類の核酸を識別し、同定するための手段としては、特性の異なった蛍光を発するビーズ、例えば、Luminex100などで核酸を標識することが行われてきた。

【0003】

しかしながら、この蛍光を用いた方法においては、最大の識別数が異なった蛍光を発する蛍光ビーズの種類に依存してしまうため、100種類以上の核酸を識別するためには、異なった蛍光を発する同数のビーズを開発する必要があった。このため、この方法では、例えば、イネのDNAのクローン50,000種類あるいはタンパク質10,000種類に対して、それぞれ異なる標識を行うことは不可能であり、その識別数に限界があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような問題点を解決するためになされたもので、その目的とするところは、核酸やタンパク質を、その種類の数に制限されることなく、効率的に標識することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、外部より非接触的に書き込み及び読み込み可能なLSI (Large scale integrated circuit) と核酸やタンパク質とを結合させ、核酸やタンパク質の情報をLSIに記録することにより、10000種以上もの多種類の核酸やタンパク質であっても効率的に識別し同定することが可能であることを見出した。本発明の方法は、従来のように物質を利用して標識するのではなく、情報を利用して標識することを特徴とするため、標識可能な物質の種類に特に制限はなく、LSIへの記録という作業を通じて簡便に標識が可能である。従って、ゲノム解析の成果として見出された多量の核酸や蛋白質であっても、本発明によれば網羅的かつ効率的に標識することが可能である。

【0006】

本発明は、より詳しくは、

(1) 標識された核酸またはタンパク質を製造する方法であって、核酸またはタンパク質とLSIとを結合させ、特定の情報をLSIに記録することを特徴とする方法、

- (2) 特定の情報が、LSIが結合される核酸または蛋白質の特徴である、(1)に記載の方法、
- (3) 核酸またはタンパク質とLSIとの結合において、基質を介在させる、(1)に記載の方法、
- (4) 基質が、セルロース酢酸ビニル、アルファシアノアクリレート、シリコン変性ポリマー、エポキシ樹脂、および硫酸カルシウムからなる群より選択される、(3)に記載の方法、
- (5) タンパク質とLSIとの結合において、該タンパク質に結合する抗体を介在させる、(1)に記載の方法、
- (6) タンパク質の糖鎖とLSIとを結合させ、タンパク質の糖鎖の特徴をLSIに記述する、(1)に記載の方法、を提供するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明は、標識された核酸またはタンパク質を製造する新規な方法を提供する。本発明の方法は、核酸またはタンパク質とLSIとを結合させ、特定の情報をLSIに記録することを特徴とする。

【0008】

本発明において「LSI」とは、通信制御を行うICやマイコン不揮発性メモリー等により構成されるLSIチップを意味する。本発明に用いる「LSI」としては、外部からの書き込み及び読みとりができるものであれば特に制限はない。LSIのメモリーは、数10万から数100万の分子を識別するためには、好ましくは32億ビット以上を有する。本発明に用いるLSIは、取り扱い易さの観点から微少であることが好ましい。LSIの市販品としては、ICカードやミューチップ（日立）を例示することができる。また、非接触型ICカードを本発明に用いることも可能である。

【0009】

本発明において「核酸」とは、DNAおよびRNAなどのポリヌクレオチドを意味する。本発明に用いる核酸の形態は、一本鎖であっても、二本鎖であってもよく、直鎖状であっても、環状であってもよい。これら核酸は、天然由来であっても、

人為的に合成したものであってもよい。また、DNAは、cDNAであってもゲノムDNAであってもよい。本発明において用いる核酸分子は、ベクターに挿入された形態でありうる。

【0010】

また、本発明において「蛋白質」とは、アミノ酸同士がペプチド結合により結合した分子を意味する。従って、本発明の蛋白質には、完全な蛋白質のほか、いわゆるオリゴペプチドやポリペプチドも含まれる。また、天然由来でもよく、人工的に合成されたペプチドであってもよい。

【0011】

LSIと核酸または蛋白質との結合の形態としては、安定した結合を維持しうる限り特に制限はなく、共有結合、ファンデルワールス力、水素結合等が考えられる。例えば、固相法によりLSIに蛋白質のアミノ基、カルボキシル基、アビジン基などを共有結合させることにより、LSIと蛋白質とを結合させることができる。

【0012】

本発明におけるLSIと核酸または蛋白質との「結合」は、直接的であっても、間接的であってもよい。従って、核酸またはタンパク質とLSIとの結合においては、例えば、基質を介在させることもできる。基質としては、親水性のものが好ましく、例えば、セルロース酢酸ビニル、アルファシアノアクリレート、シリコン変性ポリマー、エポキシ樹脂、硫酸カルシウムなどを本発明に用いることができる。疎水性のものであっても、その後の処理により親水性になるものであれば、本発明において好適に用いることができる。例えば、フッ素樹脂は疎水性であるが、レーザー光処理によりカルボン酸を生成して親水性になるため、本発明に適用しうる。基質とLSIとの結合あるいは基質と核酸やタンパク質との結合は、例えば、吸着あるいは包埋の手法で行うことが可能である。

【0013】

また、蛋白質を標識する場合には、基質を用いる以外に、蛋白質に特異的な親和性を有する化合物、例えば、抗体を用いることもできる。抗体は、蛋白質に特異性を有する限り、その形態に特に制限はなく、ポリクローナル抗体であっても

、モノクローナル抗体であってもよい。また、一本鎖抗体や抗体の断片であってもよい。

【0014】

本発明においては、核酸または蛋白質に結合されたLSIに「特定の情報」を記録することにより、該核酸または蛋白質を標識する。特定の情報としては、識別可能な情報であれば特に制限はなく、例えば、個々の核酸や蛋白質の特徴であってもよい。核酸や蛋白質の特徴としては、例えば、鎖長、鎖の数、分子量、糖鎖の特徴、活性、機能、由来などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0015】

LSIに記録された情報は、非接触的に電磁波で読み取ることができるため、本発明によれば蛋白質や核酸の識別は容易に行うことができる。また、LSIを用いれば、一群の核酸や蛋白質を電磁波の塊として読み取ることができる。このため、従来のDNAアレイや蛋白質アレイのようにガラス等の基板上に整列させることなく、簡便に一群の核酸や蛋白質を分類することが可能である。

【0016】

【実施例】

以下、本発明を実施例により、さらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例を制限するものではない。

【実施例1】 LSIで標識された核酸の調製

LSI上に貼り付けた基質、セルロース酢酸ビニル（1）、アルファシアノアクリレート（2）、シリコン変性ポリマー（3）、エポキシ樹脂（4）、硫酸カルシウム（5）上に、グルテリンcDNAあるいはリボゾーム遺伝子を添加し、3ヶ月冷蔵庫にて放置した。その後100mLの溶解緩衝液（1 mM EDTA, 0.5 M NH_4OAc , 10 mM MgCl_2 , 0.1% SDS）にて回収後、70%エタノール沈殿にて濃縮し、1%アガロースゲル電気泳動にて回収率を確認した。（5）の硫酸カルシウムにおいては核酸が吸着されてしまい回収ができなかったが、その他の基質については30%位の割合で回収できた。

【0017】

【実施例 2】 LSIで標識されたタンパク質の調製

LSI上に貼り付けた基質、セルロース酢酸ビニル（１）、アルファシアノアクリレート（２）、シリコン変性ポリマー（３）、エポキシ樹脂（４）、硫酸カルシウム（５）上に、精製タンパク質であるフォスフォリラーゼあるいは牛血清アルブミンを5mL（1 mg）添加し、3ヶ月冷蔵庫にて放置した。その後、5mLの試料用緩衝液（SDS-sample buffer）にて回収後、SDS-PAGE電気泳動しクマシーブリリアントブルー染色・脱色にて回収率を確認した。図中、Cは対象を示し、精製タンパク質である1 mgフォスフォリラーゼあるいはアルブミンを直接電気泳動した。シリコン変性ポリマー（３）においてフォスフォリラーゼについては100%、アルブミンについては90%の回収率を示した。

【0018】

【発明の効果】

従来は、多種類の核酸や蛋白質を識別するために、その種類の数に応じて、異なるシグナルを発する「物質」を開発する必要があったが、本発明の方法は、LSIという同一の物質に、識別すべき核酸や蛋白質に応じた異なる「情報」を記録し、情報の差異に基づいて識別するという手法を採用している。このため、情報の種類に制限がない以上、理論上は、識別しうる核酸や蛋白質の種類の数にも制限はない。さらに、識別が情報の内容によるため簡便かつ確実であり、また、常時認識できるという利点も有する。従って、本発明により、標識しうる核酸および蛋白質の種類および標識の効率を飛躍的に向上させることが可能となった。

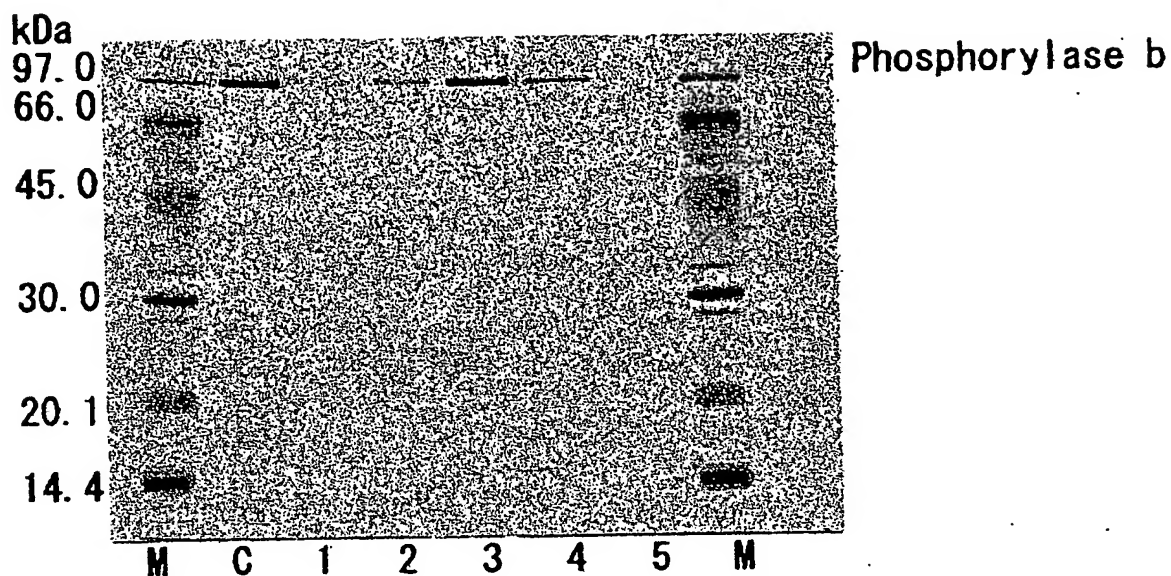
【図面の簡単な説明】

【図 1】 種々の基質を利用してLSIとフォスフォリラーゼとを結合させた場合における、フォスフォリラーゼの回収率を示す電気泳動像である。

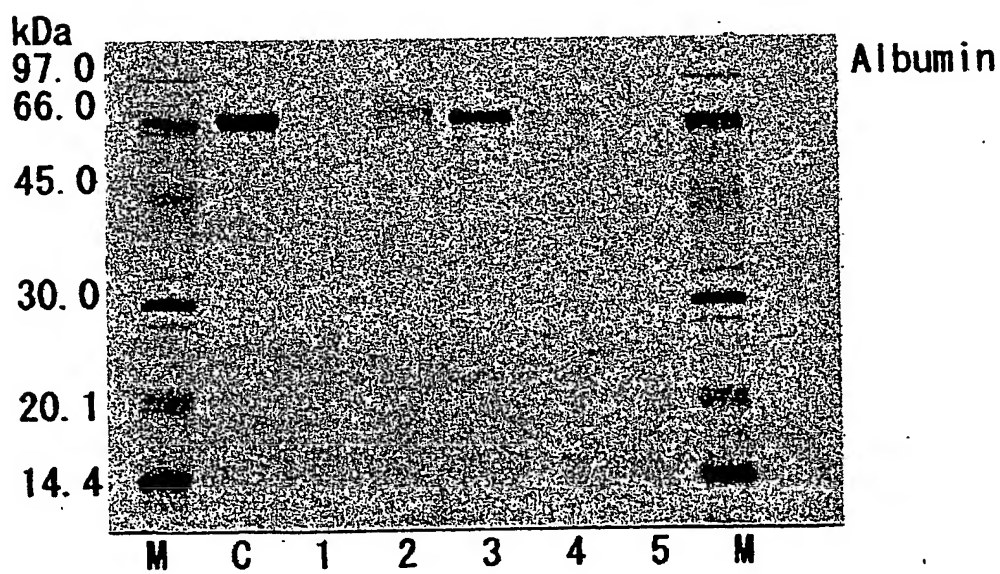
【図 2】 種々の基質を利用してLSIとアルブミンとを結合させた場合における、アルブミンの回収率を示す電気泳動像である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸やタンパク質を、その種類の数に制限されことなく、効率的に標識することを課題とする。

【解決手段】 外部より非接触的に書き込み及び読み込み可能なLSI (Large scale integrated circuit) と核酸やタンパク質とを結合させ、核酸やタンパク質の情報をLSIに記録することにより、特に核酸やタンパク質の種類の数に制限なく、これらを効率的に識別し同定することが可能であることを見出した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2002-314658

受付番号

50201633589

書類名

特許願

担当官

塩原 啓三

2404

作成日

平成14年12月16日

<認定情報・付加情報>

【手数料の表示】

【納付金額】

2,100円

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 MOA-A0209

【提出日】 平成14年11月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-314658

【補正をする者】

【識別番号】 501167644

【氏名又は名称】 独立行政法人 農業生物資源研究所

【補正をする者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 神戸大学遺伝子実験
センター内

【氏名又は名称】 大野 清春

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 神戸大学遺伝子実験
センター内

【氏名】 大野 清春

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人 農業
生物資源研究所内

【氏名】 小松 節子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 2 独立行政法人 農業
生物資源研究所内

【氏名】 高岩 文雄

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-314658
受付番号	50201689519
書類名	手続補正書
担当官	塩原 啓三 2404
作成日	平成14年12月16日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】

501167644

【住所又は居所】

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

【氏名又は名称】

独立行政法人農業生物資源研究所

【補正をする者】

【識別番号】

502392386

【住所又は居所】

兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 神戸大学遺伝
子実験センター内

【氏名又は名称】

大野 清春

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501167644]

1. 変更年月日	2001年 4月24日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市観音台2丁目1-2
氏 名	独立行政法人農業生物資源研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502392386]

1. 変更年月日

2002年10月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 神戸大学遺伝子実験センタ
ー内

氏 名

大野 清春

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.